

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

02 March 2000 (02.03.00)

International application No.:

PCT/JP99/04480

Applicant's or agent's file reference:

YCT-425

International filing date:

20 August 1999 (20.08.99)

Priority date:

21 August 1998 (21.08.98)

Applicant:

OGATA, Etsuro et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

20 August 1999 (20.08.99)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 G01N 33/68	A1	(11) 国際公開番号 WO00/11480 (43) 国際公開日 2000年3月2日(02.03.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04480 (22) 国際出願日 1999年8月20日(20.08.99) (30) 優先権データ 特願平10/236146 1998年8月21日(21.08.98) JP (71) 出願人 ; および (72) 発明者 尾形悦郎(OGATA, Etsuro)[JP/JP] 〒170-8455 東京都豊島区上池袋1-37-1 財団法人 癌研究会附属病院内 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 小泉 満(KOIZUMI, Mitsuru)[JP/JP] 高橋俊二(TAKAHASHI, Shunji)[JP/JP] 〒170-8455 東京都豊島区上池袋1-37-1 財団法人 癌研究会附属病院内 Tokyo, (JP) (74) 代理人 弁理士 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前の公開 ; 補正書受領の際には再公開される。
(54) Title: METHOD FOR DIAGNOSING BONE METASTASIS OF MALIGNANT TUMOR		
(54) 発明の名称 悪性腫瘍の骨転移を診断する方法		
(57) Abstract Therapeutic effects of drugs on bone metastasis and cancer (mammary cancer, prostatic cancer, lung cancer, etc.) inducing bone metastasis are evaluated by using a marker reflecting the activity of osteoblasts and a marker reflecting the effect of osteoclasts.		

EP

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 YCT-425	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/04480	国際出願日 (日.月.年) 20.08.99	優先日 (日.月.年) 21.08.98
出願人(氏名又は名称) 尾形 悦郎		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
 第 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁶ G01N33/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁶ G01N33/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-1999年
日本国登録実用新案公報 1994-1999年
日本国実用新案登録公報 1996-1999年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JICST、BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	小泉 満「癌の骨転移と骨代謝マーカー」CLINICAL CALSIUM, 4月号(1998), P98~100	1-7
Y		8-17
X	高橋俊二、小泉 満「骨代謝マーカーの骨転移診断における意義」Biotherapy, Vol.11, No.1, P75-80(1997)	1-7
Y		8-17
Y	中馬広一ら「骨転移病巣の治療効果判定と骨代謝マーカーと骨転移病状との相関について」Therapeutic Research, Vol.16, No.12, P212-217(1995)	8-17

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.16.99

国際調査報告の発送日

28.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

竹中 靖典

2 J

9507

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

**EXACT ENGLISH LANGUAGE
TRANSLATION OF THE PCT
APPLICATION AS
ORIGINALLY FILED**

127

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Translation

Applicant's or agent's file reference YCT-425	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/04480	International filing date (day/month/year) 20 August 1999 (20.08.99)	Priority date (day/month/year) 21 August 1998 (21.08.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/68		
Applicant OGATA, Etsuro		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 20 August 1999 (20.08.99)	Date of completion of this report 16 May 2000 (16.05.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04480

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04480

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	8-17	YES
	Claims	1-7	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-17	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-17	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 1-7

Document 1: M. Koizumi, "Bone metastasis of cancer and osteal metabolism marker," Clinical Calcium, May 1998, pages 98-100

Document 2: S. Takahashi, M. Koizumi, "Significance of osteal metabolism marker for diagnosing bone metastasis," Biotherapy, Vol. 11, No. 1, 1997, pages 75-80

Documents 1 and 2 describe a diagnostic method for bone metastasis of malignant tumors that uses a marker that reflects the activity of osteoblasts and a marker that reflects the activity of osteoclasts.

They also describe PICP, PINP, osteocalcin and BALP as markers that reflect osteoblast activity, and they describe the use of bone type-I collagen as a marker that reflects osteoclast activity.

Claims 8-17

Document 3: H. Nakane et al. "Correlation among the measurement of therapeutic effects on bone metastasis foci, osteal metabolism marker and the condition of bone metastasis," Therapeutic Research, Vol. 16, No. 12, 1995, pages 212-217

Document 3 describe a means of determining the effect of drug therapy using a marker that reflects osteoblast activity and a marker that reflects osteoclast activity.

It is obvious for persons skilled in the art to prepare an invention such as the one in this application by utilizing the markers described in documents 1 and 2 in the method for determining the effect of drug therapy described in document 3.

(51) 国際特許分類6 G01N 33/68	A1	(11) 国際公開番号 WO00/11480 (43) 国際公開日 2000年3月2日(02.03.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04480 (22) 国際出願日 1999年8月20日(20.08.99) (30) 優先権データ 特願平10/236146 1998年8月21日(21.08.98) JP (71) 出願人 ; および (72) 発明者 尾形悦郎(OGATA, Etsuro)[JP/JP] 〒170-8455 東京都豊島区上池袋1-37-1 財団法人 癌研究会附属病院内 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 小泉 満(KOIZUMI, Mitsuru)[JP/JP] 高橋俊二(TAKAHASHI, Shunji)[JP/JP] 〒170-8455 東京都豊島区上池袋1-37-1 財団法人 癌研究会附属病院内 Tokyo, (JP) (74) 代理人 弁理士 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前の公開 ; 補正書受領の際には再公開される。
(54)Title: METHOD FOR DIAGNOSING BONE METASTASIS OF MALIGNANT TUMOR (54)発明の名称 悪性腫瘍の骨転移を診断する方法 (57) Abstract Therapeutic effects of drugs on bone metastasis and cancer (mammary cancer, prostatic cancer, lung cancer, etc.) inducing bone metastasis are evaluated by using a marker reflecting the activity of osteoblasts and a marker reflecting the effect of osteoclasts.		

(57)要約

骨芽細胞の活性を反映するマーカーおよび破骨細胞の作用を反映するマーカーを用いて骨転移およびかかる骨転移を惹起する乳癌、前立腺癌、肺癌等の癌に対する薬剤の治療効果を診断する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノールウェー	YU	ユーゴスラビア
CJ	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	BT	ボタスワナ	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	KG	キルギスタン				

悪性腫瘍の骨転移を診断する方法

技術分野

- 5 本発明は、乳癌、前立腺癌、肺癌等に伴う骨転移を診断する方法、これらの疾患を治療するための薬剤の治療効果を判定する方法に関する。

背景技術

- 10 癌による骨転移の診断は、従来より臨床症状、単純X線、骨シンチグラフィ、CT、MRIなどの画像診断により行われている。画像的には、骨転移は溶骨型、骨硬化型、混合型に分類されるが、骨転移の部分での溶骨と造骨のバランスをみているわけである。画像診断法は診断能は高く有用であるが、概して高額でありスクリーニングや経過観察には適していない。

- 15 近年、骨代謝学の進歩により様々な骨代謝マーカーの開発がなされている。表1に骨形成マーカーと骨吸収マーカーを示した。これらの骨代謝マーカーでの癌の骨転移診断の試みが行われている(Koizumi, M., et al., Bone metabolic markers in bone metastases (骨転移における骨代謝マーカー) ; J. Cancer Res. and Clin. Oncol., 121: 542~548, 1995)。

表 1

<p>骨形成マーカー</p> <p>① I 型プロコラーゲンペプチド…… proliferation C 端プロペプチド (P I C P) N 端プロペプチド (P I N P)</p> <p>② アルカリホスファターゼ…… matrix formation 総アルカリホスファターゼ (A L P) 骨型アルカリホスファターゼ (B A L P)</p> <p>③ オステオカルシン (O C) …… mineralization C 端断片 中間部 I n t a c t</p>
<p>骨吸収マーカー</p> <p>① pyridinium 架橋 尿中総ピリジノリン・デオキシピリジノリン (H P L C 法) 尿中遊離デオキシピリジノリン (f D P D)</p> <p>② pyridinium 架橋結合コラーゲンペプチド断片 血中 C 端テロペプチド (I C T P) 尿中 C 端テロペプチド (C T x) 尿中 N 端テロペプチド (N T x)</p> <p>③ 酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (T R A P)</p> <p>④ galactosyl hydroxylysine (G H Y L)</p> <p>⑤ ハイドロキシプロリン</p> <p>⑥ N 端オステオカルシン</p>

骨代謝マーカーのうち多くのものは、骨基質の 90% を占める I 型コラーゲンの形成、吸収過程で血液中および尿中に放出された代謝産物を測定することにより成り立っている。すなわち、骨形成に伴い合成される I 型プロコラーゲンが I 型コラーゲンへと変換される際に放出される C 端、N 端プロペプチドは、骨形成

5 のマーカーとなる。また、骨吸収の過程では、骨基質中の I 型コラーゲンが代謝を受け血液中や尿中に放出される。これらを測定することにより骨吸収のマーカーにしようとするものである。

骨形成は、骨芽細胞の増殖、分化の過程で大きく分けて3つの相に分かれることが知られている。すなわち、骨芽細胞増殖期およびマトリックス形成期、マトリックス成熟期、および石灰化期であり、各々の相で現れるマーカーが異なることが知られている (Stein, G. S., et al. : Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation (骨芽細胞分化の過程における組織特異的遺伝子発現の調節に対する細胞成長の関係) ; FASEB J, 4 : 3111~3123, 1990)。

骨芽細胞増殖期およびマトリックス形成期ではI型コラーゲンが盛んに形成され、C端、N端のプロペプチドが血中に現れる。マトリックス成熟期には、骨でのアルカリホスファターゼ (BALP) の生成が盛んになり、この時期には血液中にBALPが分泌される。石灰化期には、オステオカルシン (OC) が出現する。このOCを欠損させたマウスでは骨形成が亢進し、OCが骨形成の抑制物質として働くことを示唆する (Ducy, P., et al. : Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice (オステオカルシン欠乏マウスにおける骨形成増大) ; Nature, 382 : 448~452, 1996)。

なお、表1の骨形成マーカーの欄において、①のproliferationが骨芽細胞増殖期およびマトリックス形成期に、②のmatrix formationがマトリックス成熟期に、③のmineralizationが石灰化期にそれぞれ対応する。

骨形成のマーカーは前述のごとく様々あるが、病態により挙動が異なることがあり、各マーカーがどの相で現れるかを理解しておくことが重要である。

骨吸収マーカーには様々なものがあるが、最近注目されているものはやはりI型コラーゲンの代謝産物である。I型コラーゲンは三重鎖構造をもつコラーゲンがピリジノリンおよびデオキシピリジノリンにより架橋された形で存在するため、骨吸収によりI型コラーゲンが破壊された時に、様々な大きさのN端およびC端の終末アミノ酸のついたピリジノリンおよびデオキシピリジノリン架橋部が血液中に放出される。

骨吸収のマーカーとして測定されているものには、架橋部のみを測定するもの (尿中ピリジノリンおよびデオキシピリジノリン ; 遊離しているもののみを測定

する)、C端のアミノ酸を含めた部分を測定するもの(CTxやICTP)、N端のアミノ酸を含めた部分を測定するもの(NTx)などがある。骨代謝マーカーの一般的な詳細については、Calvoらの総説(Calvo, M. S. et al.; Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover(骨ターンオーバーの生物学的マーカーの分子的基础および臨床応用); Endocrine Rev., 17:333~368, 1996)に詳しく記載されている。

骨転移における骨代謝マーカーは、骨粗鬆症などの代謝性の骨疾患とやや異なる動きをする。骨形成マーカーでは、PICP、BALPの上昇が骨硬化型の骨転移の代表である前立腺癌骨転移でみられるが、骨粗鬆症などで上昇するオステオカルシンはあまり増加しない。その機序については現在不明である。混合型の骨転移を呈する乳癌においては、骨形成マーカーの上昇はみられるが、前立腺癌ほどではない。溶骨型の骨転移の多い肺癌においては、骨形成マーカーはあまり増加しない。

骨吸収マーカーでは、ICTPは他の骨代謝マーカーと異なり閉経ではあまり変化しないが、癌の骨転移では増加することが判明している。骨転移検出の観点からはICTPは閉経期の骨吸収亢進の影響を受けないよいマーカーといえよう。骨吸収マーカーは、溶骨型の多い肺癌骨転移で増加するだけでなく、混合型の多い乳癌、さらには骨硬化型の前立腺癌においても増加する。

20

発明の開示

骨代謝マーカーの分野の研究は進歩が著しいが、マーカーの十分な比較検討はなされていないのが現状であり、様々な骨吸収と骨形成マーカーがあり、骨転移の診断において現時点でどのマーカーが最もよいかは断定できない。

また、骨転移の臨床診断においてどのマーカーを用いるかは各医師の判断に委ねられているため、骨転移を総合的にモニターしていく手法は未だ確立されていない。

本発明の目的は、骨転移を総合的にモニターしていくツールを提供する点にある。

本発明者らは、このような状況に鑑み、骨転移を総合的にモニターしていくツールを開発すべく鋭意研究を重ねた結果、骨芽細胞の活性を反映するマーカー（骨形成マーカー）および破骨細胞の作用を反映するマーカー（骨吸収マーカー）を組み合わせることによって上記目的を達成することができることを見だし、この知見に基づいて本発明を完成した。

すなわち、本発明は、骨芽細胞の活性を反映するマーカーおよび破骨細胞の作用を反映するマーカーを用いることを特徴とする悪性腫瘍の骨転移を診断する方法を提供する。

また、本発明は、骨芽細胞の活性を反映するマーカーおよび破骨細胞の作用を反映するマーカーを用いて薬剤の治療効果を判定する方法を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、骨芽細胞の分化に伴う種々のマーカーの発現を示す図である。

図2は、骨転移を伴う前立腺癌患者に対する化学療法剤の効果とPICP、BALPおよびオステオカルシンとの関係を示すグラフである。

図3は、乳癌患者におけるBALPおよびオステオカルシンのクロスオーバーインデックスを表すグラフである。

図4は、乳癌の治療過程におけるICTP値の変化を示すグラフである。

20 発明を実施実施するための最良の形態

以下に本発明を完成するための基礎となった知見について記載する。

(1) 骨芽細胞から産生される骨形成マーカー：

図1に示すように、骨芽細胞の分化に伴い、マーカーの発現はPICPおよびPINP（タイプIプロコラーゲンペプチド）からBALP（骨アルカリホスファターゼ）へ、さらにオステオカルシンへと変化する（Stein, G. S., et al. ; FASEB J, 4 : 3111 ~ 3123, 1990）。

(2) 骨転移を有する前立腺癌患者および乳癌患者における化学療法に対するBALPおよびオステオカルシンの反応：

骨転移の状態によって(1)の2つの骨形成マーカーのレベルが異なることを

以下の2つの実施例によって確認した。

実施例 1

1994年10月から1996年4月の間に、骨転移を有する前立腺癌患者4
5 3名、骨転移なしの前立腺癌患者46名を対象として、骨形成マーカーのレベル
を調べた。明らかに骨転移なしの前立腺癌患者46名のうち、29名は前立腺切
除または放射線治療を受けた経験があり、その他の17名は新たに診断を受けた
患者であり、骨シンチと血清サンプリングの後で前立腺切除または放射線治療を
受けた。骨転移なしの患者の平均年齢は69歳（年齢範囲47歳－85歳）であ
10 った。これらの患者の癌の進行度合は、4名の患者がステージA、14名の患者
がステージB、19名の患者がステージC、9名の患者がステージD1であった。
一方、骨転移を有する患者43名のうち、9名は新たに診断を受けて、骨シンチ
と血清サンプリングの後でホルモン療法を受けていた。その他の34名の患者は
ホルモン療法および／または化学療法による積極的な治療をこれらの療法の開始
15 時から種々の間隔で受けていた。骨転移を有する患者の平均年齢は69歳（年齢
範囲53歳－83歳）であった。

すべての患者に関して、インフォームドコンセントが得られた後、骨シンチの
際に採血して血清を分離し、分析を行うまで－40℃で冷凍保存した。血清中の
BALPをアルクファーズBキット（ALKPHASE-B kit, Metra Biosystems）を
20 用いたエンザイムイムノアッセイ（免疫測定法）で測定した。また、血清中のオ
ステオカルシンは三菱 BGP-IRMA キット（三菱化学）を用いたイムノラジオメト
リックアッセイ（放射免疫測定法）で測定した。

結果を図2に示す。図2において、Z値とは（測定値－骨転移がない患者の平
均値）／（骨転移がない患者の標準偏差値）で定義される値である。また、図2
25 においてCR、flare、NC、IMP、new、PDはそれぞれ下記の意味
を有する。

・CR: complete remission（完全寛解）。

・flare: flare up（実際には治療が有効であったにもかかわらず、

bone scan (骨シンチ) の画像上で
骨転移が進行した様にみられたもの)。

- ・NC: no change (変化が認められなかったもの)。
- ・IMP: improvement (改善の兆候が認められたもの)。
- 5 ・new: 新たに骨転移ありと診断されたもの。
- ・PD: progression of disease (疾患の進行がみられたもの)。

10 BALPおよびオステオカルシンについての上記各群におけるZ値は以下の通りであった。

BALPのZ値

	CR:	2.18
	flare:	3.40
15	NC:	8.23
	IMP:	2.39
	new:	1.82
	PD:	24.50

20 オステオカルシンのZ値

	CR:	1.30
	flare:	-0.18
	NC:	0.04
	IMP:	1.25
25	new:	0.08
	PD:	0.05

これらの値を用いてオステオカルシンとBALPとの各群におけるクロスオーバーインデックスを算出した。

クロスオーバーインデックス

CR: 0. 5 9 6
 flare: -0. 0 5 3
 NC: 0. 0 0 5
 5 IMP: 0. 5 2 3
 new: 0. 0 4 4
 PD: 0. 0 0 2

上記から明らかなように、BALPについては治療をして効果があったCRで
 10 はZ値が低く(2. 18)、悪化したPDではZ値が高い(24. 50)ことが
 分かった。一方、オステオカルシンについては治療をして効果があったCRでは
 Z値が高く(1. 30)、悪化したPDではZ値が低い(0. 05)ことが分か
 った。CRのクロスオーバーインデックスは0. 596であるのに対して、PD
 のクロスオーバーインデックスは0. 002であることから、両者は著しい差を
 15 有することが認められた。このことから、クロスオーバーインデックスにより骨
 転移の進行度合および薬剤による治療効果の程度を診断することが可能である。

実施例2

実施例1と同様にして、骨転移を有する乳癌患者644例、骨転移なしの乳癌
 20 患者206例、合計850例の乳癌患者を対象として、骨形成マーカー(BAL
 Pおよびオステオカルシン)のレベルを調べた。骨転移を有する患者においては、
 骨転移部位への化学療法または内分泌療法の治療効果により、CR、NC、IM
 P、new、PD群に分類し、それぞれの群のBALPのZ値およびオステオカ
 ルシンのZ値を求めた。さらに、これらのZ値から各々の群についてクロスオー
 25 バーインデックスを算出した。

すべての患者に関して、インフォームドコンセントを得た後、骨シンチの際に
 採血して血清を分離し、測定を行うまで-40℃で冷凍保存した。血清中のBAL
 Pはアルクファーゼ-Bキット(ALKPHASE-B kit, Metra Biosystems)を用い
 たエンザイムイムノアッセイ(免疫測定法)で測定した。また、血清中のオステ

オカルシンは、三菱 BGP-IRMA キット（三菱化学）を用いたイムノラジオメトリックアッセイ（放射免疫測定法）で測定した。結果を以下に示す。

BALPのZ値

5 CR: 0. 7 4 1
 NC: 1. 5 1 4
 IMP: 0. 7 3 5
 new: 2. 0 2 1
 PD: 5. 0 4 1

10

オステオカルシンのZ値

 CR: 0. 2 6 7
 NC: 0. 2 3 7
 IMP: 0. 0 3 9
15 new: -0. 1 6 7
 PD: 0. 5 1 6

クロスオーバーインデックス

 CR: 0. 3 6 0
20 NC: 0. 1 5 7
 IMP: 0. 0 5 3
 new: -0. 0 8 3
 PD: 0. 1 0 2

25 図3にCR、NC、IMP、newおよびPDにおけるクロスオーバーインデックスをグラフで示す。

図3から明らかなように、治療をして効果があったCRのクロスオーバーインデックスは0. 3 6 0であるのに対して、悪化したPDのクロスオーバーインデックスは0. 1 0 2であることから、両者は著しい差を有することが認められた。

このことから、乳癌の場合もクロスオーバーインデックスにより骨転移の進行度合および薬剤による治療効果の程度を診断することが可能である。

- 上記実施例 1 および 2 の結果により、骨転移があり、薬剤による治療効果がある場合（CR）はクロスオーバーインデックスが高く、効果がなく悪化している
5 場合（PD）はクロスオーバーインデックスが低いことが示された。したがって、骨転移の改善度合（治療効果）を見るには骨芽細胞のマーカーによるクロスオーバーインデックスが極めて有効であることが裏付けられた。

- 一方、前立腺癌においてはCRとIMP、NCとPDのクロスオーバーインデックスが近接しており、造骨性が主体となる前立腺癌の骨転移に対する治療効果
10 を反映している。しかしながら、乳癌においては、NCとPDは近接しているものの、CRとIMPは近接しておらず、前立腺癌とは若干異なる結果である。このことは乳癌が造骨性素因もあるものの、溶骨性素因が強い骨転移像を呈することからこのような差が生じたものと考えられる。したがって、骨転移の進行度合（増悪度合）をより正確に診断するためには、骨形成マーカーだけではなく、骨
15 吸収マーカーの測定も必要と考えられる。

- 上記実施例 1 および 2 においては石灰化期に関連するマーカーであるオステオカルシンとマトリックス成熟期に関連するマーカーであるBALPとのクロスオーバーインデックスを測定することによって、悪性腫瘍の骨転移の進行度合および薬剤による治療効果の程度についての診断を行った。さらに、本発明者らは、
20 石灰化期に関連するマーカーであるオステオカルシンと骨芽細胞増殖期およびマトリックス形成期に関連するマーカーであるPICPまたはPINPとのクロスオーバーインデックスを測定することによっても悪性腫瘍の骨転移の進行度合および薬剤による治療効果の程度についての診断を行うことが可能であることを確認している。石灰化期に関連するマーカーであればオステオカルシン以外のマ
25 ーカーも用いることができ、骨芽細胞増殖期およびマトリックス形成期に関連するマーカーであればPICPおよびPINP以外のマーカーも用いることができ、マトリックス成熟期に関連するマーカーであればBALP以外のマーカーも用いることができることは言うまでもない。

これまでに、骨形成マーカーは幾つか同定され、個々別々に測定されてきてお

り、骨芽細胞の分化・成熟に従って、産生される時期が異なることは知られていた。しかし、骨転移の指標として、どの骨形成マーカーに限定して測定したら、「骨芽細胞の分化・成熟が癌の骨転移によって抑制される」ことを反映するのは、明確にされていなかった。上記クロスオーバーインデックスという指標から
5 骨転移の進行度合および薬剤による治療効果の程度を把握するということは従来技術からは予測し得ないことであった。

一方、癌転移による骨破壊は、破骨細胞によって行われる。その際の骨吸収マーカーとしては、幾つかが知られているが、骨転移の程度（悪性度）および治療による骨破壊の抑制効果は、ICTP（タイプIコラーゲンカルボキシ末端テロ
10 ペプチド）という比較的大きな分子量のコラーゲン代謝物を同定することにより明確となり、ICTPがマーカーとして優れている（例えば、The Bone, Vol. 10, No. 3, p. 111~118, 1996を参照）。以下に、ICTPを利用した骨転移の程度および治療による骨破壊の抑制効果に関する実施例を示す。

15

実施例3：乳癌治療におけるICTPのレベル

骨転移に対する化学療法剤の併用療法（シクロホスファミド、ドキソルビシン
および5-フルオロウラシル：CAF）を受けた23名の乳癌患者についてICTPのレベルを測定した。なお、補助療法としてCAFを受けた骨転移のない9
20 名の乳癌患者を対照群とした。

すべての患者からインフォームドコンセントを得た後、骨形成および骨吸収を示す骨代謝マーカーを測定した。CAF治療開始時およびCAF治療が終わるまで毎月1回骨シンチの際に採血して血清を分離した。分離した血清は分析を行うまで-40℃で冷凍保存した。骨形成マーカーとしてBALPをエンザイムイム
25 ノアッセイ（ALKPHASE-B kit, Metra Biosystems）によって測定した。骨吸収マーカーとしてICTPをラジオイムノアッセイ（Orion Diagnostica）によって測定した。また、血清中のCA 15-3をイムノラジオメトリックアッセイ（Centocor）によって測定した。得られた測定値は平均およびSE（標準誤差）で表した。Bonferroni法による分散分析（ANOVA）を用いて有意

差検定を行った。

結果を図4に示す。図4から、PR (partial response) およびNCの患者のICTP値と比較してPDの患者のICTP値は有意に上昇した。フレア (flare) の患者のICTP値はPDの患者の場合よりも有意に低下し、NC患者およびflare-upなしのPR患者のICTP値と相違しなかった。なお、図4における、PD、フレア (flare) およびNCは実施例1の場合と同じ意味を有する。PRとは、部分的に治療効果の認められたものを意味する。

10 なお、BALPおよびCA 15-3の値はいずれも統計学的な有意差を示さなかった。

したがって、ICTPのレベルを測定することにより癌の骨転移の増悪度合を判定することができる。

15 実施例1～3によって得られた知見により、骨転移の改善度合（治療効果）を見るには骨芽細胞のマーカーを、骨転移の増悪度合を見るには破骨細胞のマーカーをそれぞれ用いて、双方のマーカーをモニターすることにより的確な診断を下すことができると言える。

産業上の利用の可能性

20 上述のように、本発明によれば、乳癌、前立腺癌、肺癌等によってもたらされる骨転移およびかかる骨転移を惹起する癌に対する薬剤の治療効果を従来方法よりもはるかに的確に診断することが可能となった。

請 求 の 範 囲

1. 骨芽細胞の活性を反映するマーカーおよび破骨細胞の作用を反映するマーカーを用いることを特徴とする悪性腫瘍の骨転移の診断方法。
- 5 2. 骨芽細胞の活性を反映するマーカーとして、
 - (1) 骨芽細胞増殖期およびマトリックス形成期に関連するマーカーならびに石灰化期に関連するマーカー、あるいは
 - (2) マトリックス成熟期に関連するマーカーおよび石灰化期に関連するマーカー
- 10 3. 骨芽細胞の活性を反映するマーカーとして、
 - (1) P I C PもしくはP I N Pおよびオステオカルシン、あるいは
 - (2) B A L Pおよびオステオカルシンを用いる、請求項1記載の診断方法。
- 15 4. 破骨細胞の作用を反映するマーカーとして骨Ⅰ型コラーゲンに関連するマーカーを用いる、請求項1～3のいずれか1項記載の診断方法。
5. 破骨細胞の作用を反映するマーカーとしてデオキシピリジノリンおよび／またはI C T Pを用いる、請求項1～4のいずれか1項記載の診断方法。
- 20 6. 石灰化期に関連するマーカーと骨芽細胞増殖期およびマトリックス形成期に関連するマーカーとの比（クロスオーバーインデックス）の値、および破骨細胞の作用を反映するマーカーの測定値に基づくか、あるいは、石灰化期に関連するマーカーとマトリックス成熟期に関連するマーカーとの比（クロスオーバーインデックス）の値、および骨Ⅰ型コラーゲンに関連するマーカーの測定値に基づく、請求項1～5のいずれか1項記載の診断方法。
- 25 7. オステオカルシンとP I C PもしくはP I N Pとのクロスオーバーインデックスの値、およびI C T Pの測定値に基づくか、あるいは、オステオカルシンとB A L Pとのクロスオーバーインデックスの値、およびI C T Pの測定値に基づく、請求項6記載の診断方法。
8. 骨芽細胞の活性を反映するマーカーおよび破骨細胞の作用を反映するマ-

カーを用いることを特徴とする薬剤の治療効果を判定する方法。

9. 薬剤が抗癌性化学療法剤である請求項8記載の方法。

10. 薬剤が骨吸収抑制剤である請求項8記載の方法。

11. 薬剤が内分泌療法剤である請求項8記載の方法。

5 12. 骨芽細胞の活性を反映するマーカーとして、

(1) 骨芽細胞増殖期およびマトリックス形成期に関連するマーカーならびに石灰化期に関連するマーカー、あるいは

(2) マトリックス成熟期に関連するマーカーおよび石灰化期に関連するマーカー

10 を用いる、請求項8～11のいずれか1項記載の方法。

13. 骨芽細胞の活性を反映するマーカーとして、

(1) PICPもしくはPINPおよびオステオカルシン、あるいは

(2) BALPおよびオステオカルシン

を用いる、請求項8～12のいずれか1項記載の方法。

15 14. 破骨細胞の作用を反映するマーカーとして骨I型コラーゲンに関連するマーカーを用いる、請求項8～13のいずれか1項記載の方法。

15. 破骨細胞の作用を反映するマーカーとしてデオキシピリジノリンおよび／またはICTPを用いる、請求項8～14のいずれか1項記載の方法。

20 16. 石灰化期に関連するマーカーと骨芽細胞増殖期およびマトリックス形成期に関連するマーカーとの比（クロスオーバーインデックス）の値、および骨I型コラーゲンに関連するマーカーの測定値に基づくか、あるいは、石灰化期に関連するマーカーとマトリックス成熟期に関連するマーカーとの比（クロスオーバーインデックス）の値、および骨I型コラーゲンに関連するマーカーの測定値に基づく、請求項8～15のいずれか1項記載の方法。

25 17. オステオカルシンとPICPもしくはPINPとのクロスオーバーインデックスの値、およびICTPの測定値に基づくか、あるいは、オステオカルシンとBALPとのクロスオーバーインデックスの値、およびICTPの測定値に基づく、請求項16記載の方法。

図 3

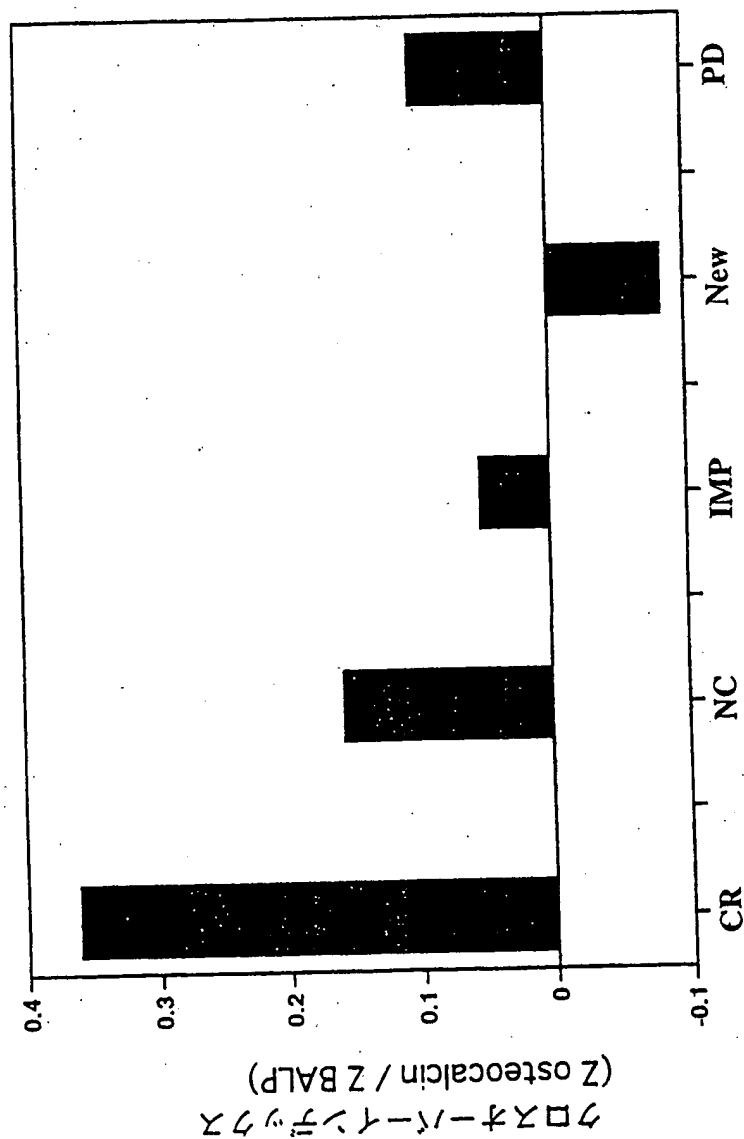
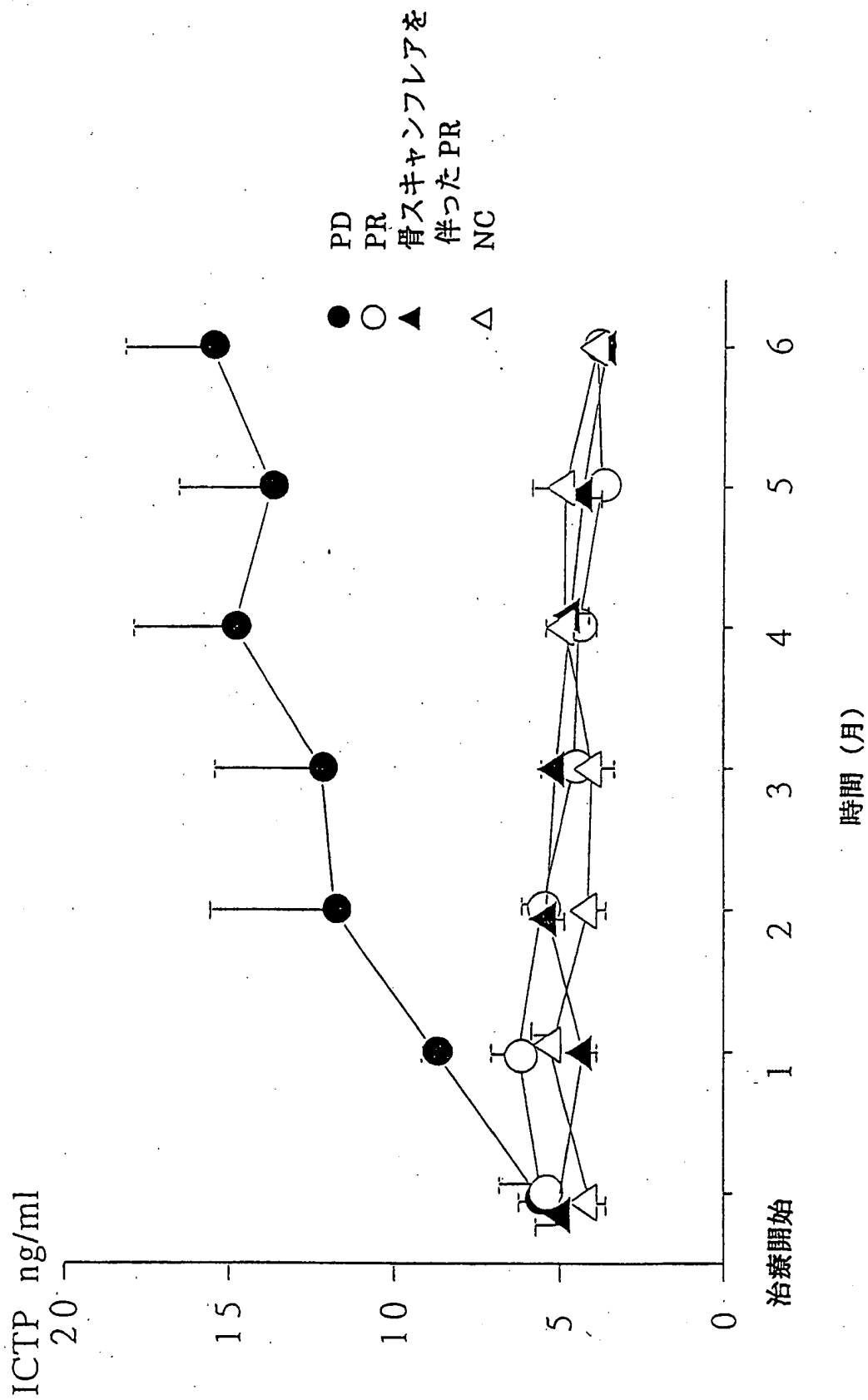


図 4



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁸ G01N33/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁸ G01N33/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-1999年
日本国登録実用新案公報 1994-1999年
日本国実用新案登録公報 1996-1999年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JICST、BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	小泉 満「癌の骨転移と骨代謝マーカー」CLINICAL CALSIUM, 4月号(1998), P98~100	1-7
Y		8-17
X	高橋俊二、小泉 満「骨代謝マーカーの骨転移診断における意義」Biotherapy, Vol. 11, No. 1, P75-80(1997)	1-7
Y		8-17
Y	中馬広一ら「骨転移病巣の治療効果判定と骨代謝マーカーと骨転移病状との相関について」Therapeutic Research, Vol. 16, No. 12, P 212-217(1995)	8-17

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 16. 99

国際調査報告の発送日

28.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

竹中 靖典



2 J

9507

電話番号 03-3581-1101 内線 3252